Untersuchungen über die Bedeutung mononukleärer Zellen für die Entstehung der experimentellen Hepatitis im Übertragungsversuch

von

Karl Mayer

aus Nürnberg

1966

1966 № 69

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT
ERLANGEN-NÜRNBERG

Direktor: Professor Dr. med. N. Henning

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BEDEUTUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN FÜR DIE ENTSTEHUNG DER EXPERIMENTELLEN HEPATITIS IM ÜBERTRAGUNGSVERSUCH

INAUGURAL*- DISSERTATION
zur
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der
FRIEDRICH-ALEXANDER-UNIVERSITÄT
zu
ERLANGEN-NÜRNBERG

vorgelegt von
Karl Mayer
aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Steinhardt
Referent: Prof. Dr. N. Henning

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 1966

EINLEITUNG

Klinische und tierexperimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß bei der Pathogenese autoimmunologisch bedingter Erkrankungen zirkulierende Antikörper für gewöhnlich keine Rolle spielen, d.h. lediglich Begleitfaktoren des Sensibilisierungsprozesses darstellen (4, 5, 12). Dagegen wurde wiederholt auf die Bedeutung der mononukleären Zellen als Überträger pathogener Antikörper hingewiesen (1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 1o, 11, 12, 13, 14). Diese Annahme stützt sich im wesentlichen auf die Tatsache, daß z.B. bei der Tuberkulinreaktion und der Homotransplantationsreaktion bei der Übertragung mononukleärer Zellen von einem sensibilisierten auf einen unbehandelten Organismus beim Empfängertier die gleiche hypergische Reaktionsbereitschaft entsteht. Außerdem finden sich im morphologischen Substrat chronisch entzündlicher Organprozesse eine bemerkenswerte Anhäufung mononukleärer Zellen. Auf Grund dieser morphologischen Besonderheiten hält man es auch bei der chronischen Hepatitis für wahrscheinlich, daß die mononukleären Zellen als Überträger immunpathogener Faktoren von Bedeutung sind.

Ziel unserer Untersuchungen war es festzustellen, inwieweit eine derartige Bedeutung der mononukleären Zellen im Tierexperiment nachweisbar ist. Dazu wurden die Lymphknoten lebergeschädigter Tiere auf unbehandelte Mäuse des gleichen Inzuchtstammes übertragen und die Lebern der Empfängertiere auf eventuell nachweisbare Veränderungen untersucht.

METHODIK

I. SENSIBILISIERUNG VON MÄUSEN MIT HOMOLOGEM LEBEREXTRAKT

In einer 1. Versuchsreihe wurde 75 männlichen Inzuchtmäusen des Stammes $C_{57}Bl$ Lebergesamtextrakt von Mäusen des AKR - Inzuchtstammes teils intraperitoneal, teils intramuskulär appliziert. Im einzelnen erhielten die Tiere 6 intramuskuläre Injektionen à o,5 ml Leberextrakt zusammen mit Freund'schen Adjuvans in einem Verhältnis 1 : 1o in wöchentlichem Abstand und ebenso viele i.p.-Injektionen à o,5 ml Leberextrakt ohne Zusatz von Freund'schem Adjuvans, ebenfalls in wöchentlichem Abstand. Nach dieser sechswöchigen Sensibilisierungsperiode erhielten die Tiere nach einer Pause von 1o Tagen nochmals eine Injektion von 1 ml Leberextrakt intraperitoneal appliziert und wurden ca. 1o - 14 Tage später getötet. Die den Tieren entnommene Leber wurde histologisch (Hämatocylin-Eosinfärbung) auf morphologische Veränderungen untersucht. Von 75 auf diese Weise sensibilisierten Tieren zeigten 15 keine wesentlichen histologischen Veränderungen, 52 Tiere zeigten bei der histologischen Untersuchung eine Infiltration der periportalen Felder mit mononukleären Zellen (Lymphozyten und Plasmazellen), Vermehrung und Schwellung der Kupffer'schen Sternzellen und Bildung von Sternzellknötchen. In vielen Fällen wurden Leberparenchymzellnekrosen beobachtet; bei 8 Tieren fanden sich umfangreiche Leberparenchymzellnekrosen (Abb. 1-2).

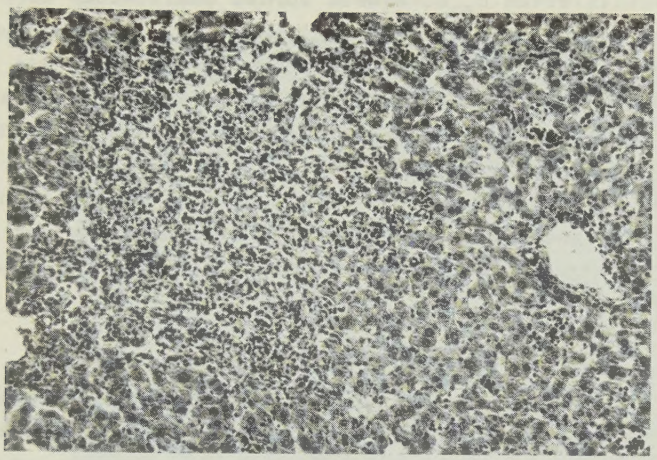

Abb. 1

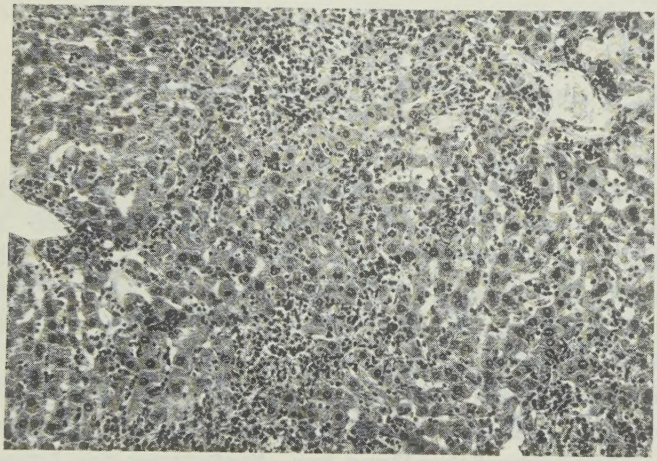

Abb. 2

Abb. 1 - 2 Leberveränderungen nach Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt zusammen mit Freund'schen Adjuvans.

Den sensibilisierten C_{57}Bl-Mäusen wurden unmittelbar nach der Tötung Lymphknoten und Milz entnommen, die Organe nach Befreiung von Bindegewebe mit Pinzetten zerzupft und die so aus den Organen gewonnenen Zellen in Hanks'scher Lösung suspendiert. Dabei handelte es sich zum größten Teil um große, mittlere und kleine Lymphozyten. Granulozyten machten nur einen sehr kleinen Prozentsatz (ca. 1 %) aus. Die Zellzahl wurde in der Zählkammer bestimmt. Die Überlebensrate der Zellen, die mit Hilfe der Nigrosinfärbung bestimmt wurde, betrug über 9o %.

11o unbehandelte C_{57}Bl-Tiere erhielten intravenös in die Schwanzvene je 25 - 3o x $1o^6$ Zellen von den mit homologem Leberextrakt sensibilisierten Mäusen des gleichen Inzuchtstammes injiziert. Zur Beurteilung sich etwa entwickelnder Leberveränderungen wurden die Tiere im Abstand von 1 - 21 Tagen nach der Injektion getötet und die Lebern histologisch untersucht.

II. VERGIFTUNG VON MÄUSEN MIT TETRACHLORKOHLENSTOFF

Eine 2. Versuchsreihe von 55 C_{57}Bl-Mäusen wurde in einem Zeitraum von 4 - 6 Wochen mit Tetrachlorkohlenstoff vergiftet. Dazu wurde den Tieren täglich Tetrachlorkohlenstoff zur Inhalation gegeben bis die Tiere eben narkotisiert waren. Außerdem erhielten sie in wöchentlichem Abstand o,1 ml Tetrachlorkohlenstoff subkutan injiziert. Nach 4 - 6 wöchiger Vergiftung wurden die Tiere getötet und die Lebern histologisch auf Veränderungen untersucht. Dabei zeigten 31 Tiere nur geringe oder gar keine morphologischen Veränderungen, nahezu regelmäßig fand sich eine trübe Schwellung bzw. Verfettung der Leberparenchymzellen. Bei 14 Tieren fand sich eine Vermehrung der Kupffer'schen Sternzellen und Ausbildung von Sternzellknötchen (Abb. 3).

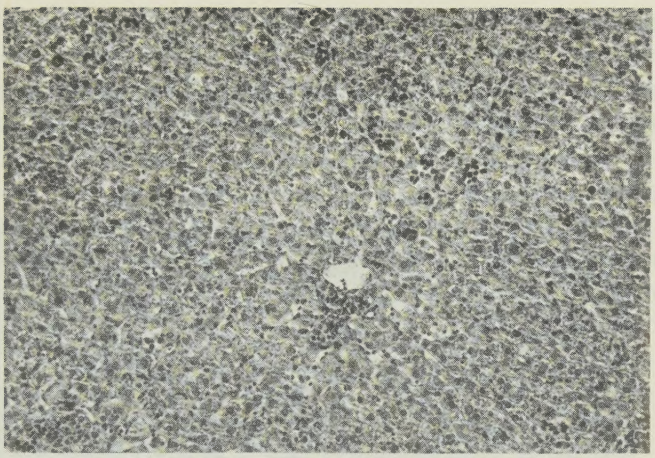

Abb. 3 Leberveränderungen nach chronischer Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff

Den Tieren wurden Lymphknoten und Milz unmittelbar nach der Tötung entnommen, die Zellen aus den Organen in gleicher Weise isoliert wie für die mit homologer Leber sensibilisierten Tiere beschrieben und auf 35 C_{57}Bl-Mäuse in einer Dosierung von 25 - 3o x $1o^6$ Zellen übertragen. Die Beurteilung der histologisch nachweisbaren Leberveränderungen erfolgte in einem Zeitraum von 1 - 9 Tage nach Übertragung der Zellen.

KONTROLLSERIE

In einer Kontrollserie wurden die Zellen von Lymphknoten und Milz von 25 unbehandelten C_{57}Bl-Tieren, deren Leber morphologisch keine Veränderungen zeigten, gewonnen und auf 18 Tiere des gleichen Inzuchtstammes in einer Dosierung von 25 - 3o x $1o^6$ Zellen übertragen. Die Beurteilung der Lebern der Empfängertiere wurde unter den gleichen Bedingungen, wie für die beiden anderen Gruppen beschrieben, vorgenommen.

ERGEBNISSE

Die histologischen Ergebnisse, die an der Leber der Empfängertiere nach Übertragung von Lymphozyten mit homologer Leber sensibilisierter Mäuse erhoben werden konnten, sind in Tabelle I zusammengefaßt.

Tab. I Histologische Leberbefunde der Empfängertiere nach Übertragung von Lymphozyten gegen homologen Leberextrakt sensibilisierter Tiere.

Tage nach Übertragung der Lymphozyten	Gesamtzahl der untersuchten Fälle	Histologischer Leberbefund normal	im Sinne der chronischen Hepatitis
1	4	0	4
2	4	2	2
3	23	12	11
6	3o	14	16
9	21	13	8
12	12	8	4
15	8	5	3
21	9	9	0

In einem Teil der Fälle kam es zu histologischen Veränderungen in Form von Vermehrung der Kupffer'schen Sternzellen, Sternzellknötchen und mäßige Infiltration der periportalen Felder, während andere Tiere keine erkennbaren morphologischen Veränderungen zeigten. (Abb. 4)

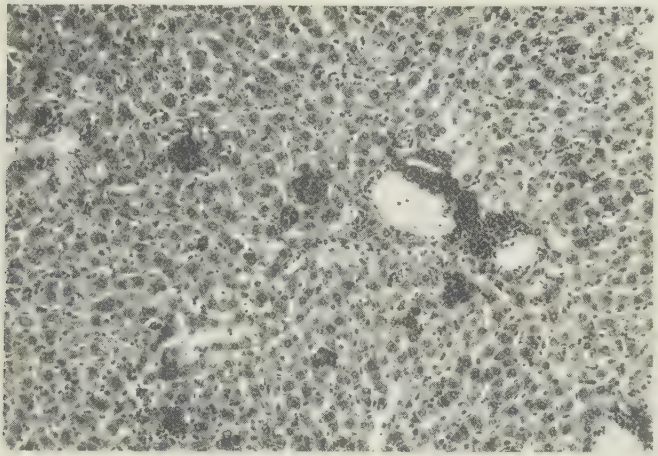

Abb. 4 Leberveränderungen im Empfängertier am 4. Tage nach passiver Übertragung von Lymphozyten lebergeschädigter Tiere.

Die ausgeprägtesten Veränderungen wurden bis zum 6. Tage nach der Zellübertragung beobachtet, nach 3 Wochen konnten morphologische Besonderheiten in keinem der Fälle mehr nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei der Übertragung von Lymphozyten der mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteten Mäuse, wie aus Tabelle II hervorgeht.

Tab. II Histologische Leberbefunde der Empfängertiere nach Übertragung von Lymphozyten mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteter Tiere.

Tage nach Übertragung von Lymphozyten	Gesamtzahl der untersuchten Fälle	Leberbefunde	
		normal	Veränderungen im Sinne einer chronischen Hepatitis
2	2	2	0
3	25	9	16
6	22	14	8
9	11	8	3

Auch hier fanden sich in der 1. Woche am häufigsten Veränderungen im Sinne der Vermehrung von mononukleären Zellen in der Leber, während sie bereits 9 Tage nach der Übertragung kaum mehr nachweisbar waren.

Bei Übertragung von Zellen unbehandelter Tiere konnten in keinem Falle derartige Veränderungen an der Leber der Empfängertiere beobachtet werden.

DISKUSSION

In früheren tierexperimentellen Untersuchungen an Kaninchen konnten wir in Übereinstimmung mit anderen Autoren nachweisen, daß zirkulierende Antikörper gegen Lebergewebsantigene, wie sie durch Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt zusammen mit Freund'schem Adjuvans erzeugt werden können, bei passiver Übertragung keine Leberschädigung bei den Empfängertieren verursachen (15). Die Übertragung von Lymphozyten lebergeschädigter Tiere führt in einem bemerkenswert hohen Prozentsatz zu einer Infiltration mit mononukleären Zellen in der Leber der Empfängertiere. Leberparenchymzellnekrosen konnten nur in seltenen Fällen nachgewiesen werden; umfangreiche Nekrosen, wie sie bei den Spendertieren beobachtet wurden, fehlten stets. Bei Übertragung von Lymphozyten unbehandelter Tiere konnten keine Leberveränderungen beobachtet werden.

Wie die zur Leberschädigung führende Reaktion bei den Empfängertieren nach Übertragung der Lymphozyten im einzelnen abläuft, läßt sich auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht ohne weiteres beantworten. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die Infiltrate ausschließlich den übertragenen Zellen der lebergeschädigten Spendertiere entsprechen. Vielmehr ist anzunehmen, daß die mononukleären Infiltrationen durch die übertragenen Lymphozyten lediglich stimuliert wurden, diese Zellen selbst jedoch größtenteils wirtseigenen Ursprungs sind.

Der Verlauf dieser Reaktion zeigte keinen wesentlichen Unterschied, ob die übertragenen Lymphozyten von mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteten Tieren stammten oder von Spendertieren, deren Leberschädigung durch Sensibilisierung mit homologem Leberextrakt erzielt worden war. Dies ist insbesondere deshalb bemerkenswert, da das Bild der Leberschädigung bei den beiden Spendertiergruppen Unterschiede nach Art und Ausdehnung zeigte, was bei Vergleich von Abb. 1 und Abb. 2 deutlich wird.

Die Leberschädigung, die sich bei den Empfängertieren nach Übertragung von Lymphozyten sensibilisierter Tiere entwickelt, ist vorübergehend, spätestens 14 Tage bis 3 Wochen nach Zellübertragung nicht mehr nachweisbar. In keinem Falle zeigen die Leberveränderungen eine Progredienz. Dieser Befund steht in Übereinstimmung damit, daß die Leberschädigung auch bei den aktiv immunisierten Tieren in der Regel keine Progredienz oder Tendenz zum Übergang in ein cirrhotisches Bild zeigt. In dieser Beziehung unterscheiden sich die im Tierexperiment durch Immunisierung erzeugten Leberschäden von der chronischen Hepatitis des Menschen wesentlich. Ein hervorstechendes Merkmal dieser Erkrankung ist ja gerade das Fortschreiten der entzündlichen Veränderungen zur Cirrhose. Insofern besitzen die Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen vorerst einen beschränkten Aussagewert für die Pathogeneseforschung der chronischen Hepatitis des Menschen.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei passiver Übertragung von Lymphozyten lebergeschädigter $C_{57}Bl$-Inzuchtmäuse kann in einem hohen Prozentsatz der untersuchten Fälle eine Infiltration der periportalen Felder sowie eine Vermehrung der Kupffer'schen Sternzellen in der Leber der Empfängertiere beobachtet werden. Dabei ergaben sich keine großen Unterschiede, ob die Zellen von Tieren stammten, deren Leber durch Tetrachlorkohlenstoffvergiftung geschädigt wurde, oder von solchen, bei denen der Leberschaden durch Sensibilisierung mit homologer Leber zusammen mit Freund'schem Adjuvans induziert wurde. Bei Kontrolltieren, die Lymphozyten von unbehandelten Tieren erhielten, wurden keine Veränderungen an der Leber der Empfängertiere beobachtet.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BERRIAN, J.H., BRENT, L.
Cell bound antibodies in transplantation immunity.
Ann. NY. Acad. Sci. 73 , 654 (1959)

2. BURNET, M.
The clonal selection theory of acquired immunity.
Cambridge Iniv. Press, London 1959

3. FELIX-DAVIES, D.
Autoimmunization in subcute thyroiditis associated with evidence of infection by mumps virus.
Lancet 1, 88o (1958)

4. GELL, P.G.H., COOMBS, R.R.A.
Clinical Aspects of Immunology.
Blackwell Scientific Publications 1962

5. GITLIN, D., JANEWAY, C.A., APT, L., CRAIG, J.M.
Agammaglobuliaemia. In cellular and humoral aspects of the hypersensitive states.
p. 375 (1959) London: Cassell

6. GOOD, R.A., ROTSTEIN, J., MAZZITELLO, W.F.
The stimulaneous occurrence of rheumatoid arthritis and agammaglobulinaemia.
J. Lab. clin. Med. 49 , 343 (1957)

7. HESS, E.V., ASHWORTH, C.T., ZIFF, M.
Transfer of an auto-immune nephrosis in the rat by means of lymphnode cells.
J. exp. Med. 115 , 421 (1962)

8. HUMPHREY, J.H.
Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states (Editor: H.S. Lawrence)
p. 1. Hoeber-Harper, New York (1959)

9. LAWRENCE, H.S.
a) The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leucocytes.
J. clin. Invest. 34 , 219 (1955)
b) Some biological and immunological properties of transfer factor.
In: Cellular aspects of immunity, a Ciba foundation symposion, p. 243 (Churchill, London 196o)

10. PATERSON, P.Y.
Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymphnode cells.
J. exp. Med. 111 , 119 (196o)

11. PERLMANN, P., BROBERGER, O.
The possible role of immune mechanisms in tissue damage in ulcerative colitis. Reports of 2nd int. Congr. on Immunopathology Kalamazoo 1961
p. 288 Ed. Grabar,P., Miescher, P.B., Schwabe und Co. Basel

12. SCHEIFFARTH, F., WARNATZ, H.
Die Pathogeneses der chronischen Hepatitis als immunologisches Problem.
Klin. Wschr. 1.5.1965, 473-479

13. SORKIN, E.
On the relation of cell fixing to cellfixed antibodies.
In R. Schuppli, 5. Europ. Allergie-Kongreß Basel,
B. Schwabe & Co. Basel, 1963, p. 249

14. WARNATZ, H., SCHEIFFARTH, F., HALFAR, I.
Nachweis zellulär fixierter Antikörper bei der Transplantationsimmunität.
Med. exp. 6 , 357 (1962)

15. WARNATZ, H., SCHEIFFARTH, F., SCHWARZ, R.
Tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese der chronischen Hepatitis. II. Mitteilung: Serologische Studien nach Sensibilisierung mit homologen Leberzellfraktionen.
Virchow's Arch. path. Anat. 339 , 364-371 (1965)

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. N. Henning für die Übernahme des Referates und Herrn Professor Dr. F. Scheiffarth für die freundliche Überlassung des Themas danken.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. H. Warnatz und Fräulein H. Blanke, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, aussprechen.

LEBENSLAUF

Am 25. Juli 1936 wurde ich, Karl Günter Mayer, als Sohn des Zahnarztes Hanns Mayer und seiner Ehefrau Rita, geb. Blackolb in Nürnberg geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Georgensgmünd, der Oberrealschule mit Gymnasium Schwabach, des Progymnasiums Oettingen/Bay. legte ich im Juli 1957 am Neuen Gymnasium Nürnberg die Reifeprüfung ab. Im Winter-Semester 1957/58 begann ich an der Universität Erlangen das Studium der Zahnmedizin, das ich, nachdem ich im November 1962 die zahnärztliche Vorprüfung bestanden hatte, im Juli 1965 mit dem Staatsexamen beendete.

Buchdruck und Fotodruck: Ludwig Müller, Erlangen, Fahrstraße 5